

## DEPLEÇÃO DO ANTICOCÍDIO NICARBAZINA EM PEITO DE FRANGO

Vivian Feddern<sup>1\*</sup>, Danniele Miranda Bacila<sup>2</sup>, Anildo Cunha Jr.<sup>1</sup>, Indianara Fabíola Weber<sup>3</sup>, Gerson Neudí Scheuermann<sup>1</sup>, Luciana Igarashi Mafra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Suínos e Aves, Núcleo Temático de Produção de Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Química, Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade do Contestado, Curso de Farmácia, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

\*Autor para correspondências: vivian.feddern@embrapa.br

### RESUMO

Na produção comercial de frangos é indispensável a utilização de anticoccidianos para preservar a saúde do plantel. Nesse sentido, um dos anticoccidianos mais utilizados é a nicarbazina. A substância é constituída de um complexo equimolar de hidroxidimetil-pirimidinol e dinitrocarbanilida (DNC), e possui limites máximos de resíduos de 200 µg/kg em carne de frango. O objetivo da pesquisa foi verificar se o período de retirada da substância da ração é adequado para permitir níveis de resíduos inferiores a 200 µg/kg, garantindo assim a segurança do consumidor. Para isso, foram criados frangos de corte em condições controladas, alimentados com nicarbazina, sendo a mesma retirada da ração em diferentes dias que antecedem o abate: 0, 2, 4, 7 e 10 dias. Para cada dia de retirada, foram abatidos seis frangos, coletando-se o músculo peitoral. A quantificação de DNC foi por LC-MS/MS. A análise estatística explorou cinco curvas para verificar qual mais se ajustou à depleção de DNC como uma função do tempo de retirada. O DNC foi rapidamente metabolizado até seis dias de retirada da nicarbazina da ração, possibilitando níveis de DNC menores que o limite máximo de resíduos estabelecido por órgãos reguladores. Portanto, podem ser recomendados 6 dias antes do abate de frangos comerciais, como tempo seguro de retirada do anticoccidiano nicarbazina da ração.

*Palavras-chave:* nicarbazina; resíduos químicos; LC-MS; período de retirada, carne de frango, Gompertz.

### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na exportação de carne de frango e destina ao mercado interno, 66% da sua produção (ABPA, 2017). Um dos problemas comuns que pode acometer a produção comercial de frangos de corte é a ocorrência da coccidiose, doença causada por um grupo de protozoários do gênero *Eimeria*. A consequência desta doença são perdas econômicas, devido à queda no desempenho e à mortalidade dos frangos (Chapman, 2014). Assim, é extremamente importante utilizar os aditivos anticoccidianos na ração de frangos de corte, para manutenção da saúde do plantel.

A nicarbazina possui vantajoso custo-benefício e dificulta o desenvolvimento de resistência das espécies de *Eimeria*, quando comparada a outros anticoccidianos. Porém, a presença de resíduos na carne tem sido uma preocupação recorrente das indústrias e órgãos regulamentadores, no sentido de oferecer um alimento seguro ao consumidor. Para isso, foram estabelecidos limites máximos de resíduos (LMRs) e período de retirada para essas e outras substâncias.

A nicarbazina é constituída de 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC) e 2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina (HDP) (Rogers et al., 1983). O DNC é considerado o resíduo marcador da nicarbazina, visto que estudos metabólicos em frangos evidenciaram que a deposição do DNC em tecidos musculares, gordura e órgãos foi muito superior aos níveis do HDP (EFSA, 2010). O amplo uso deste anticoccidiano na avicultura industrial levanta preocupações em

relação à ocorrência de seus resíduos na carne (Bacila et al., 2017; Clarke et al., 2014; Dorne et al., 2013). Em relação à segurança dos alimentos, a legislação brasileira é mais rigorosa em relação a este resíduo quando comparada aos Estados Unidos e União Europeia, estabelecendo o limite máximo de resíduo (LMR) de 200 µg/kg, conforme recomendado no Codex Alimentarius (Brasil, 2017; EFSA, 2010; FAO/WHO, 2015; USA, 2012).

O período de retirada, que por definição é considerado o número de dias que antecedem ao abate sem o uso de aditivos na ração, é a principal estratégia adotada na produção de frangos de corte para evitar não-conformidades quanto ao LMR de DNC na carne. O país segue o limite indicado pelo *Codex Alimentarius* de 200 µg/kg para carne de frango (FAO/WHO, 2015). Segundo histórico dos últimos cinco anos do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, há registros de amostras não conformes quanto à nicarbazina, expresso como DNC, oriundas de Sistema de Inspeção Federal (Brasil, 2017).

No Brasil, a concentração de nicarbazina permitida na ração é de 125 mg/kg com período de retirada de 10 dias (Brasil, 2015; Poli-Nutri, 2018), enquanto que a União Europeia permite a mesma concentração do anticoccidiano com 1 dia de retirada. No caso dos Estados Unidos, a concentração máxima permitida de nicarbazina na ração de frangos é de 181,6 mg/kg com tempo de retirada de 4 a 5 dias (EFSA, 2010; USA, 2012). Para estabelecer ou revisar o período de retirada é importante que estudos considerando outras concentrações de nicarbazina e tempos de remoção do anticoccidiano da ração sejam disponibilizados para tomadas de decisão. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a depleção do resíduo marcador da nicarbazina em carne de frango em diferentes períodos de retirada.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Os padrões nicarbazina (N3905) e seu padrão interno DNC-d<sub>8</sub> (34214) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Jurubatuba, SP), sendo todos reagentes de grau HPLC.

### **2.2 Metodologia**

#### *2.2.1 Produção da carne de frango*

Frangos de corte foram criados em boxes coletivos sobre cama de cepilho de madeira, sendo alimentados *ad libitum* com ração contendo 15 ppm de nicarbazina comercial. A substância foi retirada da ração aos 0, 2, 4, 7 e 10 dias que antecedem ao abate (42 dias de vida do frango). Para cada tempo de retirada, foram abatidos cinco frangos, com coleta imediata da carne de peito. Este tecido foi posteriormente utilizado para avaliar o conteúdo de DNC. O experimento foi autorizado pelos Comitês de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) e de Biossegurança (ComBio), ambos da Embrapa Suínos e Aves, protocolados sob número 013/2016 e 009/2017, respectivamente.

#### *2.2.2 LC-MS/MS*

As amostras oriundas do experimento a campo foram armazenadas a -20 °C até o momento da análise. O procedimento de extração e determinação de DNC seguiu o proposto por Coleman et al. (2014). A separação cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo 1290 Infinity (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA), com eluição gradiente linear em uma coluna analítica C<sub>18</sub> Symmetry (50 x 2,1 mm, 3,5 µm) da Waters (EUA)

com pré-coluna AJ0-4287 C<sub>18</sub> (4,0 x 3,0 mm) da Phenomenex (Torrance, CA, USA). A eluição gradiente da fase móvel está demonstrada na Tabela 1. O volume de injeção foi 5 µL, a nicarbazina e o padrão interno (DNC-d<sub>8</sub>) foram separados a uma taxa de 0,3 mL/min a temperatura da coluna de 40 ± 1.0 °C.

**Tabela 1** – Gradiente da fase móvel da corrida cromatográfica

Fase A	Fase B	Rampa
95%	5%	0 a 1 min
50%	50%	2 a 5 min
10%	90%	5 a 6 min
30%	70%	6 a 7 min
95%	5%	7 a 9 min

A = solução aquosa com acetato de amônio 100 mM e 0,05% ácido acético

B = solução de metanol com acetato de amônio 100 mM e 0,05% ácido acético

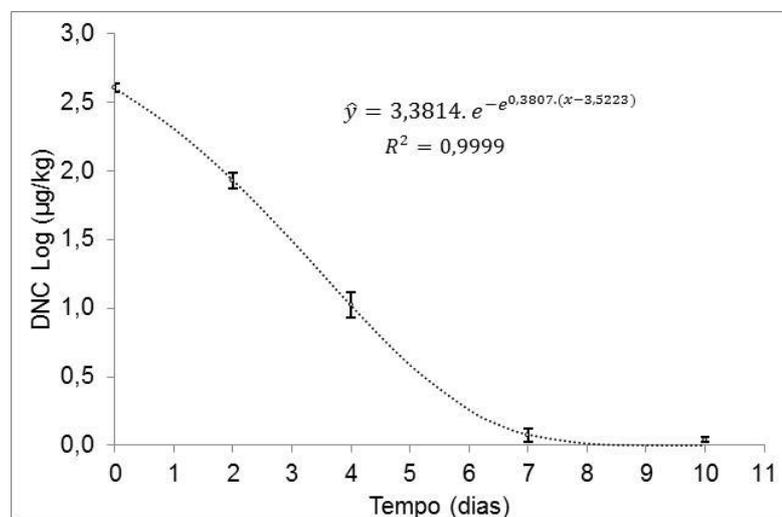
O espectrômetro de massas QTRAP 5500 (Sciex, Framingham, MA, EUA) foi operado em modo de ionização negativo (Turbo Íon Spray), com monitoramento seletivo de reações (SRM) na transição determinativa de m/z 301,0 Da → 137,0 Da para o DNC e de m/z 308,9 Da → 141,2 Da para o DNC-d<sub>8</sub>; e na transição confirmatória de m/z 301,0 Da → 106,8 Da para o DNC e de m/z 308,9 Da → 111,0 Da para o DNC-d<sub>8</sub>. Os parâmetros de operação do equipamento foram: resolução unitária; gás de cortina: nitrogênio, 25,0 CUR; potencial na fonte de íons de -4500 V; dissociação ativada por colisão, alta; potencial de orifício, 55 V; temperatura na fonte de íons, 500 °C. O software Analyst 1.6.2 (AB Sciex, Foster City, CA) realizou a aquisição e processamento de dados.

### 2.2.3 Análise estatística

A concentração de DNC foi transformada em log (DNC + 1) para atender aos pressupostos da análise de variância realizada para o modelo de delineamento inteiramente casualizado, considerando o efeito do tempo de retirada. Os detalhes da análise foram realizados por meio de análise de regressão de modelos lineares e não lineares. Foram testadas cinco equações (linear, quadrática, linha quebrada com platô, logística e Gompertz) para determinar qual se ajusta melhor em função do tempo de retirada. A escolha da melhor equação para prever a concentração de DNC foi baseada no *Akaike Information Criterion* (AIC). As análises foram realizadas utilizando os procedimentos GENMOD e NLMIXED (SAS INSTITUTE INC, 2012).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentados os resultados da concentração de DNC em função do tempo de retirada e da respectiva equação ajustada.



**Figura 1** - Depleção média de DNC e erro padrão em função do tempo de retirada da nicarbazina da ração.

Houve um efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) do tempo de retirada na concentração de DNC. A análise detalhada do tempo de retirada indicou que a equação de Gompertz apresentou o melhor ajuste baseado no valor de AIC.

Através da equação de Gompertz, partindo de uma concentração inicial de DNC =  $\log 2,60 \sim 400 \mu\text{g/kg}$  no tempo zero, ou seja, sem considerar o período de retirada se teria uma concentração duas vezes acima dos limites máximos de resíduos estabelecido pela legislação. No entanto, quando se retira a nicarbazina da ração no sexto dia que antecedem o abate, a concentração de DNC cai para LMR aceitável ( $< 200 \mu\text{g/kg}$ ), podendo ser inferido que 6 dias são suficientes para limpar o sistema do animal e deixar baixos os níveis de resíduos aceitáveis. Isto significa que os valores são inferiores aos LMR estabelecido pela legislação, abaixo do qual, não há implicação na saúde do consumidor. Além disso, deve ser considerado que a carne sofrerá tratamento térmico antes do consumo, o que reduzirá ainda mais o nível de resíduos na carne de frango (Bacila et al., 2017; Tarbin et al., 2005).

Lima et al. (2017) ao realizar experimento com frangos utilizando dois anticoccidianos (nicarbazina e narasina) observou que os níveis de DNC eram maiores quando a nicarbazina foi administrada individualmente do que quando ela foi administrada na ração, juntamente com narasina durante todo o período experimental. Os autores também afirmaram que seis dias de período de retirada são suficientes para diminuir os níveis de DNC em coxa de frango abaixo do limite de  $200 \mu\text{g/kg}$ , quando a nicarbazina foi administrada como único coccidiano. No entanto, quando a nicarbazina foi administrada de forma combinada com narasina, as concentrações de DNC foram inferiores ao LMRs após 4 dias de período de retirada.

Outros autores (Małgorzata Olejnik, Szprengier-Juszkiewicz, & Jedziniak, 2011) avaliaram resíduos de nicarbazina e narasina em tecidos de frango e ovos, em condições de cama de aviário. A concentração de DNC no fígado no dia 0 da retirada foi de  $4,44 \mu\text{g/kg}$  e rapidamente caiu atingindo o platô após 5 dias. A persistência prolongada de DNC em nível de platô e sua presença no conteúdo gástrico durante a retirada, sugerem que o DNC foi reingerido pelos animais, quando estes exerciam coprofagia na cama de aviário. A concentração de narasina em tecidos e ovos foi baixa mesmo no início do período de retirada, o que confirma a baixa probabilidade de ocorrência de resíduos de narasina nos alimentos.

## 4. CONCLUSÕES

O modelo de Gompertz foi o que melhor se ajustou à depleção de DNC como uma função do tempo de retirada. O DNC é rapidamente metabolizado a partir dos músculos do frango até seis dias de retirada, uma vez que os níveis de DNC foram menores que o limite máximo de resíduos, estabelecido por órgãos reguladores. Portanto, a carne de frango é segura do ponto de vista de resíduos do anticoccidiano nicarbazina segundo os critérios adotados no presente trabalho.

## Agradecimentos

À empresa que cedeu a nicarbazina para realizar o experimento. Aos funcionários Djalmo e Valer Felício, pelo auxílio no experimento a campo, nas instalações da Embrapa Suínos e Aves. Ao Dr. Arlei Coldebella, pelas análises estatísticas. Ao Lanagro/RS, Seção Laboratorial Avançada SLAV, de São José/SC, pelo auxílio nas determinações cromatográficas. À CAPES (1533827) e ao CNPq (421626/2016-0), pelas bolsas concedidas.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABPA. (2017). *Relatório anual*. São Paulo: Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Retrieved from [http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web\\_reduzido.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf)
- Bacila, D. M., Feddern, V., Mafra, L. I., Scheuermann, G. N., Molognoni, L., & Daguer, H. (2017). Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. *Food Research International*, 99, 31–40. Elsevier Ltd.
- Brasil. (2015). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal*. Retrieved from <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>
- Brasil. (2017). Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC/Animal. *Resultados PNCRC 2010-2016*. Retrieved April 5, 2018, from <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>
- Chapman, H. D. (2014). Milestones in avian coccidiosis research: a review. *Poultry Science*, 93(3), 501–511.
- Clarke, L., Fodey, T. L., Crooks, S. R. H., Moloney, M., O'Mahony, J., Delahaut, P., O'Kennedy, R., et al. (2014). A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Science*, 97(3), 358–374.
- Coleman, M. R., Rodewald, J. M., Brunelle, S. L., Nelson, M., Bailey, L., & Burnett, T. J. (2014). Determination and confirmation of nicarbazin, measured as 4,4-dinitrocarbanilide (DNC), in chicken tissues by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: First action 2013.07. *Journal of AOAC International*, 97(2), 630–640.
- Dorne, J. L. C. M., Fernández-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., et al. (2013). Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270(3), 196–208. Elsevier Inc.
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Koffogran (nicarbazin) as a feed additive for chickens for fattening. *EFSA Journal*, 8(3), 1551:1-40.

- FAO/WHO. (2015). *Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2015. Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015)*. Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/veterinary-drugs-mrls/pt/>
- Lima, A. L. de, Barreto, F., Rau, R. B., Silva, G. R. da, Lara, L. J. C., Figueiredo, T. C. de, Assis, D. C. S. de, et al. (2017). Determination of the residue levels of nicarbazin and combination nicarbazin-narasin in broiler chickens after oral administration. (M. Olejnik, Ed.) *PLOS ONE*, *12*(7), e0181755.
- Olejnik, M., Szprengier-Juskiewicz, T., & Jedziniak, P. (2011). Depletion study on nicarbazin and narasin in tissues and eggs of hens housed in deep litter. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *55*, 761–766.
- Poli-Nutri. (2018). Poli-Nutri. *Lista de Produtos. Poli-nicarb premix 25%*. Retrieved January 1, 2018, from [http://www.polinutri.com.br/hotsites/produtos\\_detalhe.asp?id\\_tb\\_produto=2985&id\\_tb\\_categoria=2](http://www.polinutri.com.br/hotsites/produtos_detalhe.asp?id_tb_produto=2985&id_tb_categoria=2)
- Rogers, E. F., Brown, R. D., Brow, J. E., Kazazis, D. M., Leanza, W. J., Nichols, J. R., Ostlind, D. A., et al. (1983). Nicarbazin complex yields dinitrocarbanilide as ultrafine crystals with improved anticoccidial activity. *Science*, *222*(10), 630–632.
- SAS INSTITUTE INC. (2012). System for Microsoft Windows, Release 9.4, Cary, NC, USA (CD-ROM).
- Tarbin, J. A., Bygrave, J., Bigwood, T., Hardy, D., Rose, M., & Sharman, M. (2005). The effect of cooking on veterinary drug residues in food: Nicarbazin (Dinitrocarbanilide component). *Food Additives and Contaminants*, *22*(11), 1126–1131.
- USA. (2012). *Title 21 - Food and Drugs. Chapter I - Food and Drug Administration, Department of Health and Human services. Subchapter E - animal drugs, feeds, and related products part 556 - tolerances for residues of new animal drugs in food. Subpart B - Specific Tol. US Government Publishing Office*. Retrieved January 10, 2016, from <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title21-vol6/pdf/CFR-2012-title21-vol6-sec556-445.pdf>